

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 2 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657042

研究課題名（和文） 直接蛍光標識法による細胞内 RNA 動態の可視化

研究課題名（英文） Visualization of in vivo RNA behavior by direct labeling of RNA

研究代表者

村田 隆（MURATA TAKASHI）

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・准教授

研究者番号：00242024

研究成果の概要（和文）：DNA の遺伝情報はメッセンジャーRNA に転写され、タンパク質に翻訳されて機能する。多くの場合、メッセンジャーRNA は細胞質を漂っているのではなく、細胞骨格の上に局在したり、原形質連絡を通して移動することがわかってきた。メッセンジャーRNA の局在と輸送は遺伝子発現にとっても重要にもかかわらず、生きている細胞を用いて観察する良い手段はなかった。本研究では、新しく開発された熱膨張式マイクロインジェクターを用いて、蛍光色素で標識したトマトモザイクウイルス RNA を細胞に注入し、RNA 局在を観察する方法を確立することを試みた。残念ながら、現時点では RNA の注入には成功していない。

研究成果の概要（英文）：Genetic information of DNA is transcribed to messenger RNAs, and then translated to proteins. In many cases, messenger RNAs are not suspended in cytoplasm, but localize on cytoskeletons and transported to neighboring cells. Although the localization and movement is important for gene expression, no good method for seeing RNA localization in living cells has been established. In this study, we used laser-assisted microinjector and tried to inject fluorescent-labeled tomato mosaic virus RNA for establishment of RNA visualization in living cells. Unfortunately we have not yet obtained successful results on microinjection of the fluorescent-labeled RNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：RNA、顕微鏡技術

1. 研究開始当初の背景

動物や酵母においては RNA が細胞骨格により運ばれ、細胞内の特定の領域に運ばれた後で翻訳が起こることが知られている。この RNA 輸送は不等分裂や細胞の領域特殊化などに働く。

植物細胞において RNA が細胞骨格上に局在し、細胞骨格に沿って輸送されるかは分かっていない。しかしながら、植物病原体であるタバコモザイクウイルスの RNA は細胞骨格上に局在することが示されている。そのため、

植物自身の RNA も細胞骨格上に局在して輸送される可能性は充分あると考えられる。実際、微小管とともに沈殿するタンパク質を網羅的に解析した結果、約 40% が RNA 結合タンパク質および翻訳関連タンパク質との報告もある（Chuong et al. Molecular & Cellular Proteomics 3, 970-983, 2004）。

原形質連絡を RNA が通過し、隣接する細胞で機能することが植物の発分化に重要な役割を演じている可能性がある。タバコモザイクウイルスの場合、細胞骨格上に局在する

RNA は、その後原形質連絡を通過して隣接細胞に移行する (Kawakami et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 6291-6296, 2004)。同様の細胞間移行が植物の内生 RNA でも起っている可能性があるが、タンパク質が合成されてから原形質連絡を通る例が多く、隣接する細胞で内生 RNA が RNA の形で移行することは証明されていない。

これらの情報から、生きている植物の細胞内で RNA の局在を解析することは、植物の発生分化の解析において重要な知見をもたらすと期待される。しかしながら、これまで、生きている細胞内の RNA の可視化は良い方法がなかった。従来、生きている細胞での RNA の可視化は、RNA 配列末端に特殊なタグ配列をつなぎ、そのタグ配列を認識するタンパク質等を発現させる等の方法の報告がある。しかしながら、この場合、挿入する配列が発現や局在に影響を及ぼす可能性もあり、対象とする RNA の性質がよく分かっていないと誤った解釈を生む危険性があった。また、cDNA にタグ配列を挿入するため、実験に手間がかかるのも問題であった。そこで、多くの RNA に適用できる新しい方法の開発が望まれた。

2. 研究の目的

植物細胞内の RNA 局在を観察する方法を確立するため、植物における局在の解析が比較的進んでいるトマトモザイクウイルス (タバコモザイクウイルスの近縁種で、日本国内産のウイルス) RNA を用いて、蛍光標識した RNA をタバコ培養細胞にマイクロインジェクション (顕微鏡下で注入) し、細胞内の局在を解析する。タバコモザイクウイルス RNA は、その増殖時に微小管上に局在し、その後原形質連絡を通過して隣接細胞に移行することが知られている。蛍光標識 RNA を用いて、その現象が再現するかを検討する。

トマトモザイクウイルス RNA のインジェクションに成功したら、ヒメツリガネゴケを用いて、動物細胞で局在が知られているアクチンの mRNA や、ヒメツリガネゴケで不等分裂にかかわる因子の mRNA の局在を検討する。

関連して、ヒメツリガネゴケの RNA 結合タンパク質 PpCSP が細胞骨格上に局在するか否かを調べる。PpCSP はコールドショックドメインを持つ RNA 結合タンパク質で、ヒメツリガネゴケの葉細胞から原糸体幹細胞への変換に関与する因子として解析が進んでいる。その GFP 融合タンパク質は分裂装置に局在するようだが詳細はわかっていない。ヒメツリガネゴケの幹細胞化にかかわる因子の mRNA が PpCSP を介して細胞骨格上に局在する可能性が期待されるため、RNA と PpCSP の共局在を調べる予備実験として、PpCSP が微小管上に局在するか否かを調べる。

3. 研究の方法

(1) 標識 RNA の合成

cDNA の上流に T7 プロモーターを挿入したプラスミドを準備し、cDNA の 3 端を制限酵素で切断してプラスミドを直鎖化したあとで T7 RNA ポリメラーゼで標識 RNA を合成した。

トマトモザイクウイルス cDNA (粒子形成能をなくすため、コートタンパク質をコードする部分を削除) を T7 プロモーター下流に持つプラスミド pTLW-MP-GFP (Tagami and Watanabe, Virology 361, 133-140, 2007) を準備し、鋳型 DNA の調製を行った。プラスミドを通常ミニプレップ法 (Promega Wizard Plus SV kit) で調製し、制限酵素 *Mlu*I で直鎖化した後エタノール沈殿で DNA を濃縮した。ミニプレップ時の RNase 混入を防ぐため、キットのプロテアーゼ処理時間は規定時間を厳密に守った。鋳型 DNA (約 400ng/μl) を回収し、標識 RNA の合成に用いた。

次に、蛍光標識ヌクレオチド (Alexa 488 標識 UTP, Invitrogen C11403) を取り込ませることにより、蛍光標識 RNA を合成した。RNA 合成は Ambion MEGAscript kit を用い、生体内での活性を持たせるために 5' cap analog (Ambion AM8048) を添加した。鋳型と他の試薬を混合した後で 37 °C、3 - 4 時間合成反応を行い、ポリエチレングリコール沈殿で RNA を精製濃縮した。実験によってはフェノール/クロロホルム沈殿の後で RNA を精製濃縮を試みた。

(2) マイクロインジェクション

蛍光標識 RNA をガラス針に封入し、タバコ培養細胞にインジェクションを行った。

インジェクションには熱膨張式インジェクター (LTM-1000, ネッパジーン) を用い、Okuda らの方法に従ってインジェクションを行った (Okuda et al. Nature 458, 357-391, 2009)。インジェクション用ガラス針はキャプラー作製装置 (サッター社 P-97) を用いて芯入りガラス管 (ナリシゲ GDC-1) を引くことにより作製した。溶液の封入はすべて低温室 (4 °C) で行った。合成した RNA

($>0.1\text{mg/ml}$) をインジェクション用溶液 (100mM KCl) に溶解し、ガラス針に封入してインジェクションを行った。使用したタバコ培養細胞 BY-2 はポリリジンを用いてガラスボトムディッシュに貼り付けた (Murata et al. 2013, Nature Communications in press)。インジェクション後の細胞を継続観察するため、液体培地表面にはシリコンオイル (KF96, 信越シリコーン) を滴下した。インジェクション成功の確認は蛍光色素が細胞内に導入されることを確認することにより行った。マイクロインジェクションおよびそ

の後の培養は 25 で行った。

非標識 RNA のインジェクション、トマトモザイクウイルスの移行タンパク質のインジェクションも、マーカ用の蛍光色素 (0.1mg/ml Alexa568 dextran 10000) を含んだインジェクション溶液を用いること以外は同じ方法で行った。インジェクション成功の確認はマーカ色素の細胞内導入を見ることにより行った。

(3)PpCSP の局在解析

ヒメツリガネゴケのコールドショックドメインタンパク質 (PpCSP) の遺伝子座に改変型緑色蛍光タンパク質 (Citrine) 遺伝子配列を導入し、PpCSP-citrine 融合タンパク質を発現するヒメツリガネゴケを得た。このヒメツリガネゴケに、赤色蛍光タンパク質 (mRFP) と チュープリンの融合遺伝子を発現させ、mRFP- チュープリンと PpCSP-citrine が発現するヒメツリガネゴケを得た。

4. 研究成果

(1)標識 RNA の合成とマイクロインジェクション

トマトモザイクウイルス cDNA を鋳型にして、蛍光標識ウイルス RNA が合成できた (図 1)。

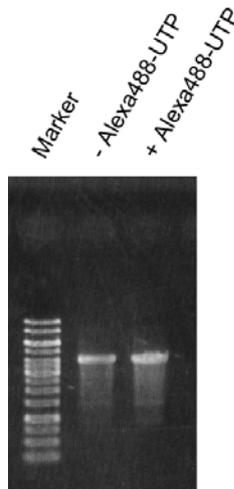


図 1 合成した標識 RNA。左：Alexa488-UTP を加えないもの (対照)、右：Alexa488-UTP を加えたもの。Alexa488-UTP を加えても RNA 合成は問題なく行えた。

しかしながら、インジェクション時に蛍光 RNA が針先に詰まってしまい、タバコ培養細胞内に導入することができなかった。合成した RNA の純度が悪い可能性と、RNA の分子量

が大きいと、粘度が上昇して詰まりやすい可能性が考えられる。蛍光ヌクレオチドはフェノールにより分解されると考えられるので、インジェクション用の蛍光 RNA のさらなる精製は行っていない。

トマトモザイクウイルスは移行タンパク質 (Movement Protein, MP) と共に移動すると考えられる。連携研究者の渡邊により無細胞系で翻訳された GFP 融合 MP をタバコ培養細胞に導入することを試みた。しかしながら、この場合も針先が詰まってしまい、導入することができなかった。

GFP 融合 MP を発現するトマトモザイクウイルス RNA のインジェクションを行った。ウイルス RNA を導入することは成功したが、導入後 12 時間経過しても MP-GFP の発現は確認できなかった。合成された RNA がウイルス活性を持つかどうかを検証するために、タバコ (*Nicotiana bensamiana*) 植物体に合成 RNA を塗布し、感染活性があるか検証する必要があると考えられる。

(2)PpCSP の局在

PpCSP-citrine と mRFP- チュープリンの局在を、間期の細胞と分裂期の細胞で詳細に比較した。PpCSP-citrine は細胞質分裂装置であるフラグモプラストに集積していたが、スピニングディスク顕微鏡を用いて局在を詳細に比較したところ、PpCSP-citrine の局在と mRFP- チュープリンの局在は微妙に異なっており、PpCSP-citrine はフラグモプラストの微小管密度が低い部分を埋めるように存在していた。また、間期の細胞でも、PpCSP-citrine は細胞質全体に存在し、mRFP- チュープリンの繊維との重なりは見られなかった。したがって、コールドショックドメインタンパク質は微小管と共局在しないと考えられる。PpCSP-citrine のフラグモプラストへの集積機構は謎であるが、フラグモプラストは ER 膜をたくさん含むので、PpCSP-citrine は ER 上に集積している可能性が考えられる。

(3)今後の展望

残念ながら、本研究の期間中には標識 RNA の細胞内局在を可視化することができなかった。RNA 合成の過程に問題がある可能性が考えられるので、より純度が高く、生物活性も高い RNA の合成を目指して合成法を改良する必要があると考えられる。

また、本研究の期間内に蛍光タンパク質様の RNA マーカー Spinach (Paige et al. Science 333, 642-646, 2011) や、インジェクション不要の RNA 配列認識 マーカー (Yamada et al. Anal. Chem. 83, 5708-5714, 2011) など、さまざまな新技術が登場している。今後は、これらの新技術の検討も含めて

研究を進めていきたい。

PpCSP の解析は、当初想定していた RNA の微小管上の局在を支持するものではなかった。しかしながら、最近、低分子 RNA が細胞間移行して、転写された細胞以外で機能することが報告されている (Miyashima et al. Development 138, 2303-2313, 2011)。したがって、細胞内の RNA 動態の可視化の必要性はむしろ高まっていると考えられる。もしもインジェクションの問題が RNA のサイズによるものなら、低分子 RNA は容易にインジェクションできると考えられる。今後は、低分子 RNA の挙動についても解析を続けていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 隆 (MURATA TAKASHI)
基礎生物学研究所・生物進化研究部門・准教授
研究者番号：00242024

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

長谷部 光泰 (HASEBE MITSUYASU)
基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授
研究者番号：40237996
玉田 洋介 (TAMADA YOSUKE)
基礎生物学研究所・生物進化研究部門・助教
研究者番号：50579290
渡邊 雄一郎 (WATANABE YUICHIRO)
東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号：60183125